第43卷 第3期
2000年8月

昆　虫　学　报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.43，No.3
Aug.，2000

文章编号： 0454-6296（2000）03-0248-07

溴氰菊酯对神经细胞钙通道和钙库的激活作用

郭朕群，贺秉军，高永闯*，孙金生，刘安西

（南开大学生物系，天津　300071）

摘要： 应用膜片钳全细胞记录方式和显微荧光测钙技术，以MN9D神经细胞为材料研究了溴氰菊酯的作用机理。低浓度（10^{-9} mol/L～10^{-7} mol/L）溴氰菊酯就能使神经细胞Ca^{2+}电流显著增加。10^{-9} mol/L，1 min时电流增加平均值为20.64%，5 min时为15.48%，表明溴氰菊酯能激活高电位激活钙通道（L型和N型），促使Ca^{2+}内流，显微荧光测定细胞内自由钙离子浓度（$[Ca^{2+}]_i$）发现，在含Ca^{2+}和无Ca^{2+}的胞外液中，溴氰菊酯均能使胞内自由钙离子数量增加，表明它能刺激胞内钙库释放Ca^{2+}。$[Ca^{2+}]_i$升高对细胞功能影响很大。

关键词： 溴氰菊酯；全细胞钳位；Ca^{2+}通道电流；$[Ca^{2+}]_i$

中图分类号： Q424　　　　**文献标识码：** A

拟除虫菊酯按结构和中毒症状可分为Ⅰ型和Ⅱ型两类化合物。Ⅰ型不带氰基，能引起虫体震颤；Ⅱ型含有氰基，引起虫体剧烈扭动[1]。溴氰菊酯（deltamethrin）属于Ⅱ型菊酯。作为一种神经毒剂，其主要作用靶标为神经膜的钠、钾离子通道。钙离子对神经细胞有很重要的生理功能，调节着许多生理活动，如递质释放、激素分泌和发挥第二信使作用等。细胞外钙离子的流入是导致细胞内自由钙离子浓度升高的主要原因，其中，通过电压门控性钙离子通道的内流尤为重要。这种钙通道普遍存在于各种组织细胞中，因此引起学者们的高度重视。在Ⅱ型菊酯研究中有人报道Ⅱ型菊酯可增强神经递质的释放[2]，尤其是在去极化时影响更明显。Clark以趋避行为作为指标研究DDT和菊酯对草履虫钙通道的作用。当草履虫接触含溴氰菊酯的外环境时，趋避行为和死亡率明显增加[3]，证明Ⅱ型菊酯是草履虫电压敏感钙通道的强激动剂。这些间接说明了Ⅱ型菊酯可作用于细胞钙离子及其通道。但是关于Ⅱ型菊酯直接作用于神经细胞钙离子通道的报道不多，因此本文通过膜片钳全细胞钳位方式记录分析电压依赖性钙通道（Voltage operated calcium channels，VOCs）电流、显微荧光技术测定细胞内自由钙离子浓度（$[Ca^{2+}]_i$）的方法研究溴氰菊酯对钙通道和胞内钙库的直接作用，进一步探讨Ⅱ型菊酯的作用机理，为杀虫剂混配和增效提供理论依据。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39670499）

*现工作单位：河北廊坊师范专科学校，邮编：065000

收稿日期：1998-09-20；修订日期：1999-10-14

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　MN9D 细胞：由 Choi 建立的一种多巴胺神经细胞系。它由胚胎大鼠中脑多巴胺神经元与成神经瘤细胞株 N18TG2 融合杂交而成，在细胞特性上与中枢 DA 神经元相似，为长梭型分化细胞。

1.1.2　细胞培养：培养基 DMEM（Sigma），附加 10%FBS，80 U/mL 青霉素和链霉素及分化剂（Sodium butyrate，1 mmol/L），pH7.3。传代时先将预先切割好并涂以poly-(D)-Lysine 的盖玻片（0.5 cm×0.5 cm）数块放入培养皿中。细胞密度为每皿70 000个。于 37℃，10% CO_2 孵育箱中培养 4～6 天，隔天换液。

1.2　试剂

1.2.1　胞外液（测钙通道电流用）：NaCl 140 mmol/L，CsCl 5.4 mmol/L，$BaCl_2$ 10.8 mmol/L，$MgCl_2$ 1 mmol/L，D-Glucose 10 mmol/L，Hepes 10 mmol/L，pH=7.3，用 CsOH 调 pH。

1.2.2　电极内液：CsCl 100 mmol/L，$MgCl_2$ 5 mmol/L，EGTA 10 mmol/L，ATP 10 mmol/L，cAMP 0.25 mmol/L，GTP 0.3 mmol/L，Hepes 40 mmol/L，pH=7.3，用 CsOH 调 pH。

1.2.3　胞外液（荧光测钙用）：NaCl 140 mmol/L，KCl 2 mmol/L，Hepes 10 mmol/L，Glucose 40 mmol/L，BAS 0.05%，pH=7.3，用 NaOH 调 pH。

有钙离子时，溶液加入 $CaCl_2$ 2.5 mmol/L，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1 mmol/L。

无钙离子时，$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 3.5 mmol/L。

1.2.4　溴氰菊酯：纯度 100%，南开大学元素有机化学研究所提供。用丙酮配成 10^{-2} mol/L 母液，再用细胞外液将母液稀释为 10^{-9} mol/L～10^{-4} mol/L 溶液。

1.3　实验方法

1.3.1　高电位激活钙离子通道电流的记录：以膜片钳全细胞方式（whole-cell mode）记录钙通道电流。在倒置显微镜下选定合适细胞并移至视野中央，然后用微操纵器将玻璃微电极移至细胞上方，微施正压并进入溶液，迅速接近细胞，电极接近细胞膜后，微施负压，使细胞膜片和电极尖端形成紧密封接，然后用短促有力的负吸引——负压击穿膜片，适当调节阻容补偿即可进入全细胞电压钳位实验。玻璃毛坯（GG-17，上海脑研究所生产）经电极拉制仪（PP-83，日本）两次拉制，成尖端直径 1～2 μm，电阻 2～5 MΩ 的玻璃微电极，电流信号经微电极通过膜片钳放大器（PC-2 型，华中理工大学生物物理研究所）放大后送入计算机显示、打印和数据处理。

1.3.2　加药方法：药品配成终浓度后加入尖端直径为 10 μm 玻璃管中，在显微镜下用微操纵器将加药管移至距细胞 50 μm 处，施加压力使药喷出，镜下可见药液流过选定的细胞。

1.3.3　神经细胞荧光负载和单细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定：细胞外液中加入 1 μmol 的 Fura-2/AM 荧光染料，37℃孵育 30 min，吸出胞外液，用 Hepes-Hanks 液（pH7.4）冲洗 3 次，除去未负载的 Fura-2，将贴附有神经细胞的盖玻片取出放置于 Zeiss 倒置荧光显微镜测定板上，通过可程控单色光源，光电倍增管。采集荧光信号和分析自由钙离子浓度由计算机完成，计算公式为：

$$[Ca^{2+}]_i = K_{off}(R - R_{min})/(R_{max} - R), \qquad R = F_{345}/F_{380}$$

其中 F_{345}、F_{380}为激发光波长分别为 345 nm，380 nm 时的发射荧光强度，K_{off}为有效结合常数。R_{min}、R_{max}和 K_{off}用膜片钳全细胞方式获得。由于测定中存在格室（apartment）效应，$[Ca^{2+}]_i$ 有一定误差，但基本上可以快速（1 μmol/L $[Ca^{2+}]_i$ 需时 1.5 ms）灵敏地反映胞内自由钙离子浓度的变化情况。

2 结果

2.1 正常神经细胞高电位激活 Ca^{2+} 通道电流

在神经细胞中有两种高电位激活钙通道（H-VOCs）：L 型和 N 型，它们均有适中的单通道电导，约 15 ps，通过不同的电压依赖性失活率调节钙电流，因此属于电压门控性离子通道。

钙电流的衰减程度比其它通道电流严重的多，称为钙电流衰减（rundown）现象，这是由于胞内某些组分、能量物质的流失或降解造成的。虽然可通过各种措施获得相对稳定的钙电流，但钙电流衰减现象是不可能完全消除的。在封接和吸破细胞记录钙电流的最初 5 min 内，钙电流不稳定，20 min 后衰减严重，5～15 min 内相对稳定。因此实验均保证在形成全细胞封接后 5～15 min 内完成。第 1 次记录与第 2 次记录（加药组在此期间加药）间隔1 min，5 min 后进行第 3 次记录。

为了减少 Ca^{2+} 电流，钙电流衰减现象引起胞外 Ca^{2+} 内流造成胞内 Ca^{2+} 升高，影响测试精度，胞外液中除用 Ba^{2+} 代替 Ca^{2+} 外，同时用离子阻断通道电流的影响。

图 1 表示全细胞钳位状态下，保持电位为 − 40 mV，系列去极化脉冲为 − 30 mV～ + 50 mV，步进间隔为 10 mV，总共进行 9 次记录，脉宽 80 ms，两次脉冲间隔 20 s。第 1 次记录保持电位为 − 40 mV，给予 0 mV，时程 80 ms 的单一去极化刺激。以 9 次钙电流峰值作I～V 曲线。曲线中可以看到在 15 min 时 Ca^{2+} 电流稍有衰减，小于 10%。Ca^{2+} 电流在第 1 次记录后 1 min、5 min 时差异不显著，虽有衰减，但基本符合药理实验的要求。因此本实验对溴氰菊酯的观察，主要是在 1 min 和 5 min 进行。

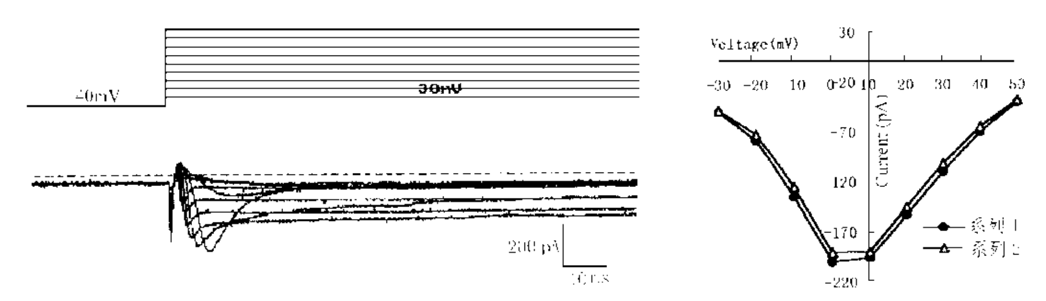


图 1 正常神经细胞高电位激活 Ca^{2+} 电流和I～V 曲线

Fig. 1 Calcium currents (H-VOCs) of normal neuron and I～V curve

系列 1：1 min (Series 1：1 min)；系列 2：15 min (Series 2：15 min)

2.2 溴氰菊酯对高电位激活 Ca^{2+} 通道电流的作用

在保持电位 − 40 mV，给予 0 mV，脉宽 80 ms 的单一去极化刺激，引导出正常 Ca^{2+} 电流，然后吹加 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L 的溴氰菊酯，1 min、5 min 时记录 Ca^{2+} 电流，观察其变化。结果见图 2～图 4，表 1。

表 1　不同浓度的溴氰菊酯在不同时间对高电压激活 Ca^{2+} 电流的影响

Table 1　The effect of different deltamethrin concentrations on calcium currents (H-VOCs) at different time

溴氰菊酯浓度（mol/L） Del. concertration	时间（min） Time	电流增加平均百分率（%） Mean percentage of current increase	标准方差 Standard square deviation	n
10^{-9}	1	20.64	0.0409	8
	5	15.48	0.0219	
10^{-8}	1	29.55	0.1034	9
	5	15.84	0.0333	
10^{-7}	1	43.29	0.1316	10
	5	14.48	0.0284	

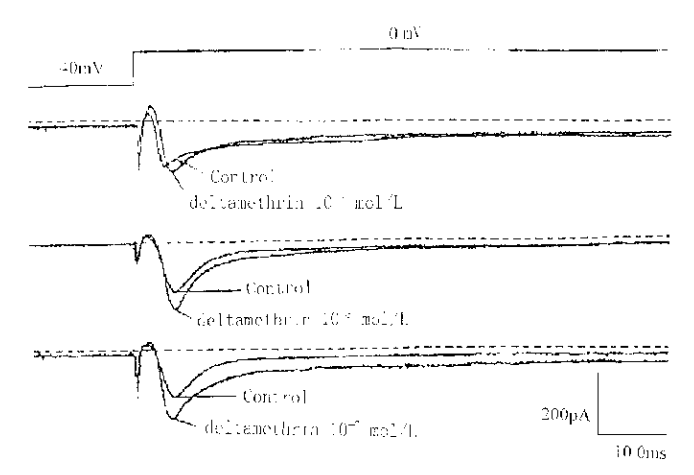


图 2　吹加溴氰菊酯 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L 前后 Ca^{2+} 电流变化情况

Fig. 2　Change of calcium currents with puff deltamethrin 10^{-9} mol/L～10^{-7} mol/L

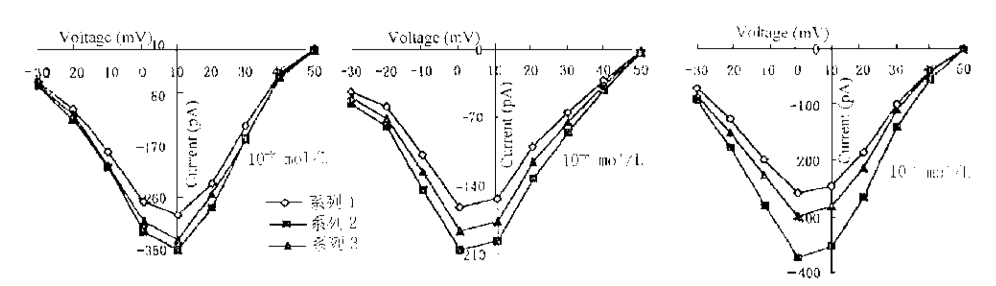


图 3　吹加 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L 溴氰菊酯，1 min，5 min Ca^{2+} 电流Ⅰ～Ⅴ曲线

Fig. 3　Ⅰ～Ⅴ curve with puff deltamethrin 10^{-9} mol/L～10^{-7} mol/L at 1 min and 5 min

系列 1：对照（Series 1：Control）；系列 2：加药后 1 min（Series 2：1 min after puff deltamethrin）；

系列 3：加药后 5 min（Series 3：5 min after puff deltamethrin）

从上面的电流图，Ⅰ～Ⅴ曲线图和表 1 数据可以看出：10^{-9} mol/L～10^{-7} mol/L 的溴氰菊酯均使高电位激活 Ca^{2+} 电流明显增加，电流增加百分率随浓度升高而升高，5 min 时电流值虽然

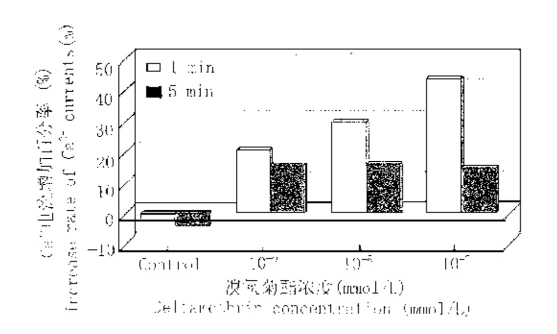


图4 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L 溴氰菊酯，1 min，5 min 对 Ca^{2+} 电流增加百分率

Fig. 4 Increase rate of Ca^{2+} currents (%) at 1 min and 5 min with deltamethrin concentrations

高于初始值，但都有不同程度的下降，致使三个浓度在此时的 Ca^{2+} 电流增加百分率趋于接近。实验说明 1 min 时 Ca^{2+} 电流随浓度升高而增加显著，5 min 时虽有增加，但较 1 min 时 Ca^{2+} 电流有所下降。

2.3 溴氰菊酯对细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

实验中选取荧光强度适中，有活性的细胞。首先持续监测其 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化 100 s 以上作为参比。选用 $[Ca^{2+}]_i$ 变化不大，基本保持稳定的细胞加菊酯，每种浓度用 3 个细胞。先作正常胞外液（$[Ca^{2+}]_o$ = 2.5 mmol/L），后作无钙胞外液，目的在于研究胞外、胞内 Ca^{2+} 在菊酯作用下对细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响。

图 5 所示为在正常胞外液中吹加 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}和 10^{-6} mol/L 的溴氰菊酯，从曲线中可看到吹加菊酯后（箭头所指）细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 均有增加。除随溴氰菊酯浓度升高加药次数减少外，$[Ca^{2+}]_i$ 增加所需时间也减少。图 6 为在无 Ca^{2+} 胞外液中吹加 10^{-9}和 10^{-8} mol/L 溴氰菊酯前后 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化，曲线表明 $[Ca^{2+}]_i$ 也有不同程度增加。

图5 正常胞外液$[Ca^{2+}]_o$ = 2.5 mmol/L，吹加 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}和 10^{-6} mol/L 溴氰菊酯时 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

Fig. 5 Change of $[Ca^{2+}]_i$ with puff deltamethrin 10^{-9} mol/L～10^{-6} mol/L in normal bath solution（$[Ca^{2+}]_o$ = 2.5 mmol/L）

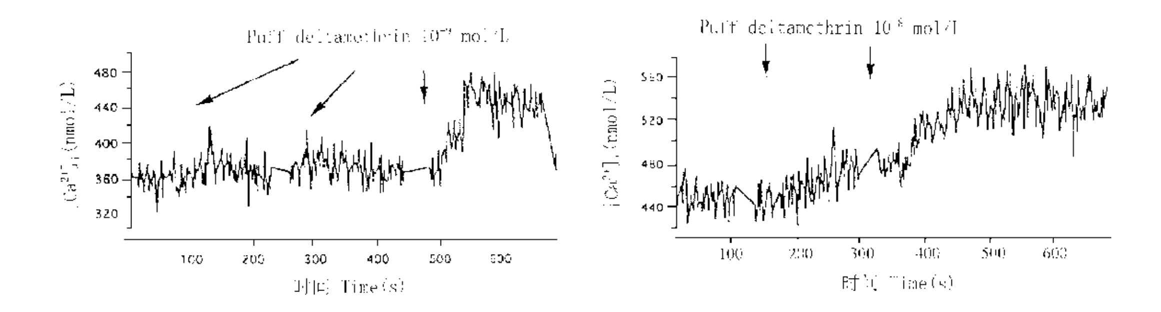


图 6　无 Ca^{2+} 胞外液吹加 10^{-9}、10^{-8} mol/L 溴氰菊酯时 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

Fig. 6　Change of $[Ca^{2+}]_i$ with puff deltamethrin 10^{-9} mol/L～10^{-8} mol/L in calcium-free bath solutions

3　讨论

实验结果表明低浓度的溴氰菊酯（10^{-9} mol/L）就可使 Ca^{2+} 电流显著增加，因此溴氰菊酯是高电位激活钙通道 L 型、N 型的强烈激动剂。记录的 Ca^{2+} 电流随溴氰菊酯浓度增加而明显升高，说明溴氰菊酯对钙通道的作用具有浓度依赖性。但 5 min 后记录到的 Ca^{2+} 电流都有不同程度的降低。三种浓度 Ca^{2+} 电流增加率相近，差异不大（但仍高于正常值）。通过显微荧光测定细胞内 $[Ca^{2+}]_i$，发现溴氰菊酯在正常胞外液中能使细胞内 Ca^{2+} 数量增加。从图 5 中可看到 Ca^{2+} 的增加与菊酯浓度有一定关系，随菊酯浓度升高，增加细胞内钙离子所需时间减少，但升高幅值相差不明显。四种浓度（10^{-9} mol/L～10^{-6} mol/L）溴氰菊酯都可以使 Ca^{2+} 不可逆地增加。细胞内钙离子来源有两个：胞外 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 库释放。全细胞钳位实验证明溴氰菊酯是高电位激活钙通道的激动剂，在其作用下钙通道开放，胞外 Ca^{2+} 通过钙通道内流引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高。在无 Ca^{2+} 胞外液中，$[Ca^{2+}]_i$ 仍能升高，升高幅值与前者差异不大，时间稍有延迟，这表明胞内钙库在溴氰菊酯作用下也能释放 Ca^{2+}。因此溴氰菊酯一方面作用于钙通道，加强 Ca^{2+} 内流，另一方面刺激胞内钙库释放 Ca^{2+}，具有双重作用，从而使细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 迅速升高。

作为第二信使的胞内 Ca^{2+}，调控许多重要生理过程，其中 $[Ca^{2+}]_i$ 信号的变化存在严格的稳态机制，即浓度限定在一个很窄范围内（20 nmol/L～100 nmol/L），当溴氰菊酯作用于细胞膜钙通道和钙库后，胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 持续升高，超过正常值许多倍，溴氰菊酯引发的 Ca^{2+} 严重超载本身能对细胞造成巨大损伤，同时又会对细胞生理功能产生重大影响。就神经分泌细胞而言，其分泌首先受到影响。在突触信号传递中，突触前膜神经末梢 Ca^{2+} 有两种功能：一是促使突触小泡从神经末梢的储存隔室转移到突触前膜的可释放区，释放量取决于每次可直接融合到突出前膜的小泡数量；二是 Ca^{2+} 进入神经末梢导致囊泡入坞与突出前膜形成融合小孔复合体后开放，释放递质[4]。溴氰菊酯刺激细胞内自由钙离子浓度升高，从而促使神经递质过量分泌，严重时导致分泌枯竭。

此外，Enan 报道溴氰菊酯可直接刺激蛋白激酶 C/磷酸化通路，使 IP_3 和自由 Ca^{2+} 增加，使蛋白整体磷酸化水平升高[5]。Matsumura 报道溴氰菊酯使突触的一些关键蛋白恢复去磷酸化的时间延长，其中反应最强烈的是钙调神经磷酸酶依赖的蛋白激酶和突触蛋白（synapsin I）[6]。这种

蛋白存在于所有突触末端，是突触小泡外面的一种镶嵌蛋白。可见溴氰菊酯通过作用于 Ca^{2+} 通道和 Ca^{2+} 库使胞内［Ca^{2+}］$_i$ 升高，同时还影响 Ca^{2+} 相关蛋白及酶等多种途径造成神经递质过量分泌，导致突触信号传导异常，乃至造成整个生物体损伤。因此，Ca^{2+} 通道、Ca^{2+} 库及神经突触也是溴氰菊酯的重要作用靶标。那么溴氰菊酯如何作用于胞内 Ca^{2+} 库促使其释放 Ca^{2+} 呢？它是作用于细胞膜通过信号介导，还是进入细胞直接作用于 Ca^{2+} 库质膜，有待进一步研究。

参 考 文 献 （References）

［1］ Vershoyle R D，Aldridge W N. Structure-activity relationships of some pyrethroids in rats. Arch. Toxicol.，1980，454：325～329

［2］ Nicholson R A，Wilson R G，Potter C *et al*. In Pesticide Chemistry，Human Welfare and the Environment. Oxford：Pergamon Press，UK，1983. 75～90

［3］ Clark J M，Edman S J，Nagy S R *et al*. Action of DDT and pyrethroids on calcium channels in *Paramecium tetraurelia*. American Chemical Society，1995，Chapter11

［4］ 陈宜张. 分子神经生物学. 北京：人民军医出版社，1995. 208～209

［5］ 刘安西，王秀玲，吕宪寓等. 分子神经生物学. 天津：南开大学出版社，1992. 90～104

［6］ Matsumura F，Clark J M，Matsumura F M. Deltamethrin causes changes in protein phosphorylation activities associated with post-depolarization events in the synaptosomes from the optic lobe of squid，*Loligo pealei*. Comp. Biochem. Physiol.（C），1989，94（2）：381～390

Active effect of deltamethrin on calcium channels and calcium store of culture neurons

GUO Zhen-qun，HE Bing-jun，GAO Yong-chuang，SUN Jin-sheng，LIU An-xi
（Department of Biology，Nankai University，Tianjin 300071，China）

Abstract: The effect of pyrethroid insecticide deltamethrin on mesencephalic originated dopaminergic cell line MN9D was investigated by using the patch-clamp and Fura-2 microfluorimetric techniques.

Whole cell calcium current recordings showed: deltamethrin activated calcium channels（H-VOCs）and increased the amplitude of calcium currents greatly by about 20.64% in 1 min and 15.48% in 5 min at very low concentration（10^{-9} mol/L）.

Deltamethrin could increase the［Ca^{2+}］$_i$ in both normal and calcium-free bath solutions. This indicates deltamethrin could stimulate the calcium store to release the cytosolic free Ca^{2+}. We conclude deltamethrin stimulates［Ca^{2+}］$_i$ entry through the calcium channels and release of Ca^{2+} from intracellular store. Prolonged elevation of［Ca^{2+}］$_i$ will affect many cellular process and cause cytotoxic to the cells.

Key words: deltamethrin; whole-cell clamp; H-VOCs;［Ca^{2+}］$_i$